

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0648-04

白藜芦醇经蛋白激酶 G 影响豚鼠 心室肌细胞 L-型钙通道*

易方方, 唐其柱, 冯斯婷, 王 腾
(武汉大学人民医院心血管内科, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的: 研究白藜芦醇经蛋白激酶 G 对正常豚鼠心室肌细胞 L-型钙电流(I_{Ca-L})的影响。方法: 采用全细胞膜片钳技术, 记录给予白藜芦醇前后 I_{Ca-L} 的变化, 并分别记录给予蛋白激酶 G (PKG) 特异性激动剂 8Br-cGMP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、PKG 特异性拮抗剂 H8 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后白藜芦醇对 I_{Ca-L} 的影响。结果: (1) 白藜芦醇呈浓度依赖性抑制 I_{Ca-L} , $1, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可使 I_{Ca-L} 峰值分别低 $18.31\% \pm 0.68\%$, $56.20\% \pm 2.19\%$, $84.51\% \pm 2.52\%$ ($n=5, P<0.05$), 但对 I_{Ca-L} 激活电位、峰电位、反转电位均没有影响; (2) $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8Br-cGMP 轻度抑制 I_{Ca-L} , 电流密度低 $10.50\% \pm 1.11\%$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8Br-cGMP + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇使 I_{Ca-L} 电流密度降低 $87.58\% \pm 3.49\%$ ($n=6, P<0.05$); (3) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H8 对 I_{Ca-L} 无影响, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H8 + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇对 I_{Ca-L} 无抑制作用。结论: 白藜芦醇浓度依赖性抑制豚鼠心室肌细胞 I_{Ca-L} , 此作用机制可能与 PKG 激活有关。

[关键词] 白藜芦醇; 钙通道; 蛋白激酶 G; 心肌细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of resveratrol on the L-type calcium current by protein kinase G pathway in isolated guinea pig ventricular myocytes

YI Fang-fang, TANG Qi-zhu, FENG Si-ting, WANG Teng

(Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of resveratrol on the L-type calcium current in isolated guinea pig ventricular myocytes. **METHODS:** The whole cell patch clamp method was used. **RESULTS:** (1) Resveratrol ($1, 50, 100 \mu\text{mol/L}$) reduced the I_{Ca-L} by $18.31\% \pm 3.15\%$, $56.20\% \pm 2.50\%$ and $84.51\% \pm 4.01\%$ in a concentration-dependent manner ($n=5, P<0.05$). But it has no change on I-V shape of I_{Ca-L} . (2) 8Br-cGMP ($100 \mu\text{mol/L}$), an activator of protein kinase G (PKG), deduced the density of I_{Ca-L} by $10.50\% \pm 1.11\%$. Applying resveratrol and 8Br-cGMP simultaneously decreased the I_{Ca-L} significantly by $87.58\% \pm 3.49\%$ ($n=6, P<0.05$). (3) $5 \mu\text{mol/L}$ H8, a PKG inhibitor, inhibited the decrease in I_{Ca-L} caused by resveratrol. **CONCLUSION:** Resveratrol inhibits I_{Ca-L} in guinea pig ventricular myocytes, and this inhibitory effect involves the PKG pathway.

[KEY WORDS] Resveratrol; Calcium channels; Protein kinase G; Cardiomyocytes

白藜芦醇(resveratrol, 3,5,4'-trihydroxyrans stilbene)是葡萄属植物产生的一种植物抗毒素,化学名 3,5,4'-三羟基-反-二苯代乙烯^[1]。它广泛存在于多种天然植物中,在常见的中草药如虎杖、何首乌中含量也很丰富。白藜芦醇具有广泛的心血管保护作用,被认为是葡萄酒中发挥心血管保护作用的主要功能因子^[2]。本试验采用膜片钳技术研究白藜芦醇对豚鼠心室肌细胞 L-型钙通道的影响及其可能的信号转导机制。

材 料 和 方 法

1 溶液与试剂

无钙台氏液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 135, KCl 5.4, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.33, 葡萄糖 20, HEPES 10, pH 7.38 (NaOH 调节); KB 液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 谷氨酸 50, KOH 85, KCl 30, MgSO_4 3, 牛磺酸 20, 葡萄糖 10, HEPES 10, EGTA 0.5, pH 7.2 (KOH 调节); 电极外液组成为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 37, 氯化胆碱 100, CaCl_2

[收稿日期] 2005-08-08 [修回日期] 2005-10-25

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670216)

1.8, $MgCl_2$ 0.5, HEPES 10, 葡萄糖 10, C_5Cl 4.6, pH 7.3 (C_5OH 调节); 电极内液组成为 ($mmol \cdot L^{-1}$): C_5Cl 120, $CaCl_2$ 1.0, $MgCl_2$ 5, Na_2ATP 5, EGTA 11, HEPES 10, 葡萄糖 11, pH 7.4 (C_5OH 调节)。

I型胶原酶、蛋白酶 E、HEPES 购于 Gibco 公司, 8Br-cGMP、H8、 C_5OH 、 C_5Cl 、 Na_2ATP 为 Sigma 产品, 其余均为国产分析纯。白藜芦醇购于西安赛得高科生物股份有限公司。

2 细胞分离

健康成年豚鼠, 250-350 g, 雌雄不拘, 由武汉大学医学院动物中心提供。心室肌细胞分离如文献所述^[3]。腹腔注射肝素 $500 U \cdot kg^{-1}$, 头部击昏, 迅速开胸取出心脏置于 100% O_2 饱和的 4 °C 生理盐水中冲洗, 剪开心包, 连接于 Langendorff 心脏灌流装置上逆行灌流, 灌流压维持在 70 mmH₂O, 无钙台氏液灌流 3-5 min, 冲出心脏内残留血液, 心脏完全停跳后, 然后改用含 $0.33 mg \cdot L^{-1}$ I型胶原酶, $0.1 mg \cdot L^{-1}$ 蛋白酶 E 的低钙液 (Ca^{2+} $80 mmol \cdot L^{-1}$) 灌流 3-5 min, 至心脏膨大松弛流出液成丝后取下, 除去心房, 在含 BSA $1 g \cdot L^{-1}$ 的 KB 液中剪碎心室肌, 温孵 (37 °C), 稀释, 倒出上清液, 此为第 1 份细胞贮存液。剩余的沉淀部分继续用 KB 液温孵, 稀释, 倒出上清依次可以得到多份细胞贮存液。灌流液始终给予 100% O_2 饱和, 循环水浴使灌流液保温在 37 °C 左右。

3 全细胞记录技术

吸数滴细胞保存液加于 1.5 mL 灌流槽, 置于倒置显微镜 (Olympus IX70) 载物台上, 待细胞静置贴壁, 细胞外液灌流清洗细胞, 电极选用硬质玻璃 (上海神经生理所提供), 经微电极拉制仪 (Narishige PB-7) 二次拉制而成, 电极充以内液后阻抗 3.5-5 M Ω 。选取横纹清晰, 表面无颗粒, 无收缩的细胞, 采用微电极操纵仪 (Narishige MD 320, 日本) 移动电极, 当电极尖端与细胞表面形成高阻封接后 (>2 G Ω), 补偿电极与细胞膜之间的电容, 进一步给负压吸破细胞膜, 经电容电流和电极串联补偿即可行全细胞记录。应用 EPC-9 放大器 (HEKA, electronic, Lambrecht, 德国) 记录电流并存于计算机中。所有实验均在 20-22 °C 下进行。

4 I_{Ca-L} 记录程序

采用保持电位 -40 mV, 指令电压 -40 - +60 mV, 钳制时间 200 ms, 阶跃 10 mV 的刺激程序引出 I_{Ca-L} 。保持电位位于 -40 mV 使 T-型钙电流和钠电流失活, 电极内外液均用 C_5Cl 阻断钾电流。并

且记录 7 个细胞 30 min 内“rundown”现象, 得出在 12 min 内衰减明显, 所有的电流记录均在电流稳定后进行。

5 给药

白藜芦醇于 DMSO 中配成 $1.5 mmol \cdot L^{-1}$ 保存液, 8Br-cGMP, H8 于去离子水中分别配成 15, $0.75 mmol \cdot L^{-1}$ 保存液, 每次实验时, 将保存液溶于电极外液中配成实验所需终浓度进行灌流, DMSO 终浓度低于 0.1%。

6 统计学处理

采用 pluse 软件对全细胞记录进行图形与数据转换, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, Original 6.0 软件对数据进行统计学处理, 并绘制 I-V 曲线。药物作用前后采用配对 t 检验。

结 果

1 白藜芦醇对 I_{Ca-L} 的作用

白藜芦醇 ($1-100 \mu mol \cdot L^{-1}$) 浓度依赖性使 I_{Ca-L} 下降, $1 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ 分别使 I_{Ca-L} 峰值降低 $18.31\% \pm 0.68\%$ 、 $56.20\% \pm 2.19\%$ 、 $84.51\% \pm 2.52\%$ ($n=5, P < 0.05$) (图 1)。白藜芦醇作用后洗脱, I_{Ca-L} 大部分恢复 (图 2)。

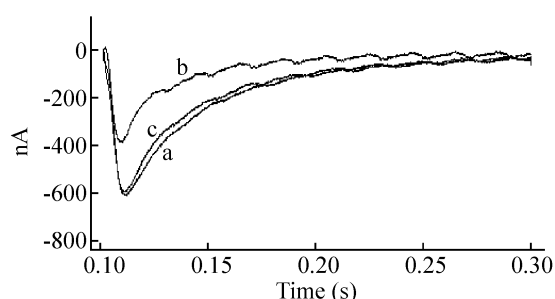


Fig 1 Effect of different concentration resveratrol on I_{Ca-L} . a: control; b: $1 \mu mol \cdot L^{-1}$ resveratrol; c: $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ resveratrol; d: $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ resveratrol.

图 1 不同浓度白藜芦醇对 I_{Ca-L} 的影响

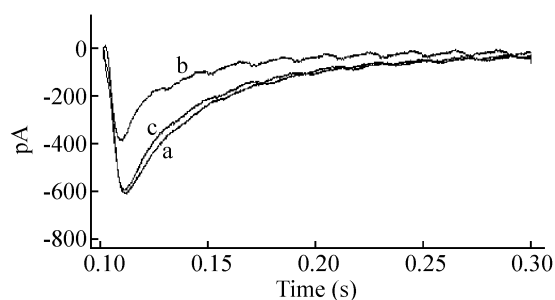


Fig 2 Effects of resveratrol and wash out on I_{Ca-L} . a: control; b: $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ resveratrol; c: wash out.

图 2 白藜芦醇作用及洗脱后对 I_{Ca-L} 的影响

白藜芦醇($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 $I_{\text{Ca-L}}$ - V 曲线的影响:在各测试电压下,电流均减少,不改变曲线形状,对最大激活电压、反转电位均无影响(图 3)。

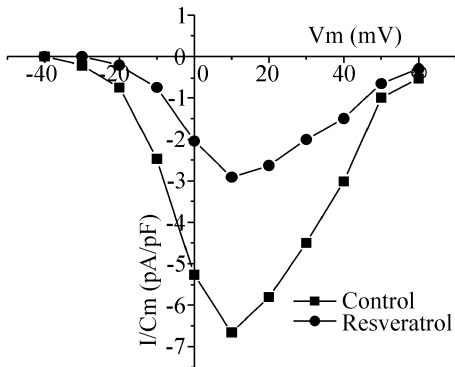


Fig 3 Effect of $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol on the $I_{\text{Ca-L}}$ current - voltage relationships ($56.20\% \pm 2.19\%$, $P < 0.01$ vs control).

图 3 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的 I - V 曲线的影响

2 8Br - cGMP 对白藜芦醇抑制 $I_{\text{Ca-L}}$ 的影响

$100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8Br - cGMP 对 $I_{\text{Ca-L}}$ 有轻微抑制作用,使 $I_{\text{Ca-L}}$ 低 $10.50\% \pm 1.11\%$, 5 min 后再加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇,发现 $I_{\text{Ca-L}}$ 低了 $87.58\% \pm 3.49\%$ ($n = 6, P < 0.05$) (图 4)。

3 H8 对白藜芦醇抑制 $I_{\text{Ca-L}}$ 的影响

$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H8 对 $I_{\text{Ca-L}}$ 无影响,5 min 后再给予 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇, H8 完全阻断白藜芦醇对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的抑制效应(图 5)。

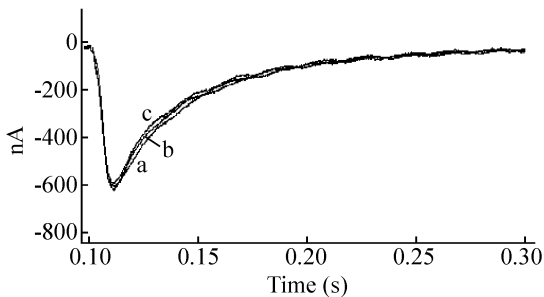


Fig 4 Effect of 8Br - cGMP on resveratrol - induced inhibition of $I_{\text{Ca-L}}$. a: control; b: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8Br - cGMP; c: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8Br - cGMP.

图 4 8Br - cGMP 对白藜芦醇诱导 $I_{\text{Ca-L}}$ 抑制作用的影响

讨 论

心肌细胞 L - 型钙通道具有重要的生理和病理生理意义,它参与动作电位平台期的形成和兴奋 - 收缩耦连以及触发细胞内钙的释放。本研究应用全细胞膜片钳技术研究不同浓度白藜芦醇对豚鼠心室

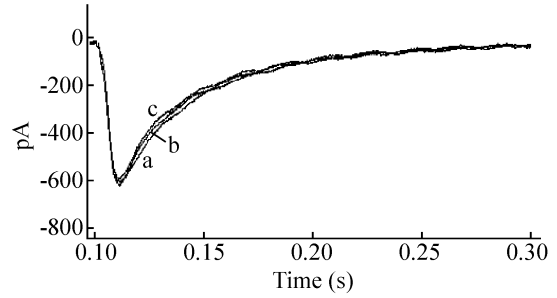


Fig 5 Effect of H8, an inhibitor of PKG, on resveratrol - induced inhibition of $I_{\text{Ca-L}}$. a: control; b: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H8; c: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H8.

图 5 H8 对白藜芦醇诱导 $I_{\text{Ca-L}}$ 抑制作用的影响

肌细胞 $I_{\text{Ca-L}}$ 的作用,并研究 PKG 特异性激动剂 8Br - cGMP 和拮抗剂 H8 对白藜芦醇作用于 $I_{\text{Ca-L}}$ 的影响。结果表明,白藜芦醇浓度依赖性地抑制心肌细胞的 $I_{\text{Ca-L}}$,使 I - V 曲线上移,但对曲线的形状、最大激活电压、反转电位均无影响,经洗脱后 $I_{\text{Ca-L}}$ 基本恢复,白藜芦醇对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的抑制作用是可逆性的。8Br - cGMP 对白藜芦醇作用于 $I_{\text{Ca-L}}$ 有协同效应, H8 能完全阻断白藜芦醇对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的抑制效应,说明 PKG 途径可能参与了白藜芦醇对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的阻断作用。

白藜芦醇可以增加一氧化氮合酶,尤其是诱生型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的表达,增加 NO 的含量,从而激活鸟苷酸环化酶(GC),提高环磷酸鸟苷(cGMP)水平^[4]。Hattoti 等^[5]和 Hung 等^[6]发现白藜芦醇发挥心肌保护作用与 NO - GC - cGMP 途径有关。Imamura 等^[7]在 iNOS 基因敲除小鼠上进一步证实通过该信号通路发挥作用。

本研究结果表明白藜芦醇对豚鼠心室肌细胞钙通道的影响也与 NO - GC - cGMP 途径有关。cGMP 的下游产物为 PKG 的激活,目前关于经 NO - GC - cGMP - PKG 途径对钙通道的抑制作用机制没有一致观点, Hartzell 等^[8]认为 cGMP 作为 cAMP 的拮抗剂,加快 cAMP 的降解,阻断 cAMP 对钙通道的磷酸化作用从而减少通道的开放机率; Cuppoletti 等^[9]研究发现 cGMP 通过激活一种分子量为 47 kD 的紧密连接蛋白发挥对钙通道的抑制作用。总之,白藜芦醇经 PKG 途径对钙通道的阻断作用可以减少细胞内钙离子浓度,减少“钙超载”的可能性,从而达到保护心肌的目的,这可能是白藜芦醇对损伤心肌的保护机制之一。

[参 考 文 献]

[1] Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol by grape berries in different developmental stages

[J]. *Am J Enol Vitic*, 1991, 42(2): 41 - 46.

[2] 刘兆平, 霍军生. 白藜芦醇的生物学作用[J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2002, 29(3): 146 - 147.

[3] Kazuto Y, Muneshige K, Masahiro A, et al. An improved method for isolating cardiac myocytes useful for patch clamp studies[J]. *Jpn J Physiol*, 1990, 40(1): 157 - 163.

[4] Bradamante S, Barengi L, Piccinini F, et al. Resveratrol provides late - phase cardioprotection by means of a nitric oxide - and adenosine - mediated mechanism[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 465(1 - 2): 115 - 123.

[5] Hattori R, Otani H, Maulik N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol; role of nitric oxide[J]. *Am J Physiol*, 2002, 282(6): H1988 - H1995.

[6] Hung LM, Su MJ, Chu WK, et al. The protective effect of resveratrols on ischemia - reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135(7): 1627 - 1633.

[7] Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol; an insight with iNOS knockout mice[J]. *Am J Physiol*, 2002, 282(6): H1996 - H2003.

[8] Hartzell HC, Fischmeister R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca^{2+} current in single heart cells[J]. *Nature*, 1986, 323(6085): 273 - 275.

[9] Cuppoletti J, Thakkar J, Sperelakis N, et al. Cardiac sarcolemmal substrate of the cGMP - dependent protein kinase[J]. *Membr Biochem*, 1989, 7(3): 135 - 142.

国际老年痴呆协会中国委员会

“2007 年神经科学新进展国际论坛” ——中日韩及亚太地区老年性痴呆及临床神经病学 最新成果、最新进展征文通知

由国际老年痴呆协会中国委员会, 中日韩及亚太地区老年性痴呆组委会主办, 中国科协国际部批准的“首届中日韩及亚太地区神经科学新进展国际论坛”定于 2007 年 7 月 7 - 8 日在中国北京友谊宾馆举办。中、日、韩及亚太地区多位著名专家、学者将就神经科学的基础和临床进行研讨交流并进行国际间的合作。凡未在国内外刊物上公开发表的有关老年期痴呆、神经免疫、神经疾病等研究新进展、经验总结等方面的论文均可投稿。

1 征文范围

(一) 老年期痴呆 1, 诊断; 2, 发病机理; 3, MCI 诊断标准及治疗; 4, 痴呆早期检测方法; 5, 老年期痴呆药物设计创新及治疗新方法; 6, 老年期痴呆伴发的精神行为障碍及其治疗; 7, 老年期痴呆的护理进展; 8, 构筑老年期痴呆患者及其家属的社会保障体系; 9, 老年期痴呆防治战略; 10, 对老年期痴呆患者及其家庭的援助及法律支持; 11, 痴呆的行为心理疏导及治疗方法; 12, 血管病理与 AD 的相关性; 13, 老年期痴呆中医药治疗探讨; 14, 老年期痴呆的非药物治疗探讨; 15, 中、日、韩等及亚太地区痴呆的流行病学研究; 16, 认知障碍评估及康复医疗探讨; 17, 老年期痴呆实验动物模型; 18, 社区医疗及其发展。

(二) 神经科学的基础和临床 1, 神经变性病, 帕金森病, 其他脑、脊髓、神经、神经肌肉接头和肌肉疾病; 2, 影像学技术对神经变性病和脱髓鞘病的诊断价值; 3, 神经系统变性病和免疫性疾病的治疗; 4, 大剂量免疫球蛋白; 5, 免疫抑制剂: 肾上腺皮质激素、硫唑嘌呤、环孢霉素 A、麦考酚酸酯、环磷酰胺等。

(三) 其他 会议邀请中外多位著名专家到会演讲并将汇编论文专集, 欢迎大家届时前往参会。

2 征文要求

论文摘要 500 - 800 字(中英文各一份), 请用 A4 纸, 4 号字打印。请注明单位地址、电话、手机和电子邮箱地址, 以电邮方式发至 adi_china2004@yahoo.com.cn 或 Adi_china@cast.org.cn 也可以软盘(Word 格式)寄至北京海淀区中关村南大街 16 号 518 室(邮编: 100081)信封左下角务必注明“2007 年神经科学新进展国际论坛征文”

多媒体幻灯片及投稿截止日期: 2007 年 5 月 15 日。

联系地址: 国际老年痴呆协会中国委员会, 中日韩及亚太地区老年性痴呆组委会

北京市海淀区中关村南大街 16 号 518 室(100081)

秘书处联系人: 王锐 张懿

联系电话/传真: 010 - 62103134

E-mail: ADI_china2004@yahoo.com.cn ADI_china@cast.org.cn

会议网站: www.caad.org.cn

中日韩及亚太地区老年性痴呆组委会

国际老年痴呆协会中国委员会

2006 年 12 月 3 日